

类产碱假单胞菌耐热碱性脂肪酶 基因的克隆*

翁丽星^{1,2} 胡志浩¹ 邓子新¹ 施巧琴² 吴松刚² 李阜棣¹

(¹ 华中农业大学生命科技学院 武汉 430070)

(² 福建师范大学生物工程学院 福州 350007)

摘 要 将类产碱假单胞菌(*Pseudomonas pseudoalcaligene*)总 DNA 经 Sau3AI 部分酶解后的 35~50 kbDNA 片段与经 BamHI 线性化及 CIAP 处理过的粘粒 pIJ285 连接,以大肠杆菌 LE392 为受体,构建类产碱假单胞菌的基因文库。通过三丁酸甘油酯平板和橄榄油平板法检测克隆子,获得一株具有耐热碱性脂肪酶活性的菌株 LE392(pHZ1401)。随后将 pHZ1401 上的外源 DNA 片段进行亚克隆,从而获得了具有脂肪酶活性的菌株 HB101(pHZ1402)和 HB101(pHZ1403),它们分别携带有 2.9 kb 和 3.0 kb 的外源片段。两外源片段约有 2 kb 的重叠区。HB101(pHZ1403)所分泌的脂肪酶活性比 HB101(pHZ1402)高 4 倍,是出发菌的 5 倍。

关键词 类产碱假单胞菌,耐热碱性脂肪酶,基因克隆

碱性脂肪酶是在碱性条件下水解脂肪分子中甘油酯键的一种酶^[1],水解脂肪后的产物为甘油二酯、甘油一酯、脂肪酸和甘油。它是一种重要的工业酶类,应用于食品加工、制药、皮革脱脂和洗涤等许多行业。因此,提高这类酶的产量有重要的应用价值。另外,对脂肪酶这类“界面酶”的催化作用方式和结构模型等分子机理的了解甚少,而仅用生化手段对它们进行分析有一定的难度。目前,人们已把注意力集中到克隆和鉴定脂肪酶基因,研究其表达调控方式,以提高脂肪酶的产量。并寄望通过分析脂肪酶的一级结构,揭示脂肪酶结构和功能间的关系。类产碱假单胞菌产生的脂肪酶具有耐热性能好和耐碱性强的优点,比一般的中性脂肪酶具有更广泛的用途。在自然条件下,该菌的酶产量低,利用常规育种方法难以满足工业化生产的要求。因此,我们尝试了利用分子遗传操作技术,克隆类产碱假单胞菌产酶基因,以便对该基因进行深入分析的工作。本文即报道这方面的克隆结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 类产碱假单胞菌(*pseudomonas pseudoalcaligene*)由福建师范大学生物工程学院提供。大肠杆菌 BHB2688、BHB2690 用来提取 λ 噬菌体包装蛋白,大肠杆菌

* 国家自然科学基金委员会杰出青年科学基金、国家教委跨世纪人才基金和福建师大资助课题。

本文于1996年6月24日收到。

LE392、HB101 作为克隆宿主^[2], 粘粒 pIJ285 (3.8 kb, 具 cos 位点和氨苄青霉素抗性基因) 和质粒 pUC118 (作为亚克隆载体) 的图谱和特征分别见文献 [2] 和 [3]。

1.1.2 培养基及培养条件: 大肠杆菌用 LB 及 LA 培养^[4], 适当时候, 添加 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的氨苄青霉素, 培养温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 。类产碱假单胞菌亦能在 LA 培养基上生长, 最适产酶培养基为发酵培养基 (%) : 黄豆饼粉 2.5, 玉米浆 1.0, 小麦粉 1.0, NaNO_3 0.5, K_2HPO_4 0.5, pH9.4~9.6, 培养温度为 28 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.1.3 酶和试剂: Sau3AI、BamHI、 T_4 DNA ligase、CIAP 和 RNase 等工具酶均购自 Promega、Gibco-BRL 和 Boehringer 等公司。氨苄青霉素和罗丹明 B 购自华美生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 基因文库的构建方法: 见文献 [2]。

1.2.2 阳性重组子的脂肪酶活性的筛选及脂肪酶活性的检测: 以三丁酸甘油酯平板法^[1] 进行初筛, 以橄榄油平板法^[5] 进行复筛。以 NaOH 直接滴定法^[1] 定量检测脂肪酶活力。

1.2.3 阳性重组子的亚克隆: 见文献 [2]。

2 结果

2.1 基因文库

2.1.1 用两个溶源菌制备包装提取物: 先对大肠杆菌 BHB2688 和 BHB2690 进行 λ 噬菌体溶源状态的检查。这两株菌保持温度敏感和紫外线敏感, 则可将它们进行诱导, 制备包装蛋白提取物。包装提取物用 λ 噬菌体 DNA 进行效价测定, 结果为 7.8×10^8 。

2.1.2 类产碱假单胞菌总 DNA 的分级离心^[2]: 分离提纯该菌的总 DNA^[6]。建立部分酶切条件, 根据酶切后片段主要集中在 35~50 kb 的条件对总 DNA 进行大量酶解, 经 10%~40% 蔗糖梯度超离心, 异丙醇沉淀, 分部收集 35~50kb 的 DNA 片段。

2.1.3 包装、感染: 经 BamHI 消化、纯化、脱磷酸的 pIJ285 载体与合适大小的外源片段以 9:1 的分子比连接、包装。取少量包装反应物感染在 TB 中生长过夜的大肠杆菌 LE392 的新鲜培养液, 从而获得 1 000 多个重组子。

2.2 酶活检测

从 1000 个重组子中初筛出四个具有

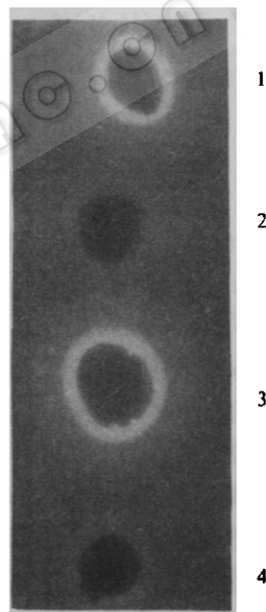


图 1 分别携带 pHZ1402 和 pHZ1403 的大肠杆菌菌株的脂肪酶活性

1. HB101 (pHZ1402); 2. 在初筛板上有水解圈而在复筛板上无桔黄色荧光圈的一个亚克隆子; 3. HB101 (pHZ1403); 4. 大肠杆菌 HB101。

Fig.1 Lipase activity of *E. coli* carrying pHZ1402 and pHZ1403 respectively

1. HB101 (pHZ1402); 2. A subclone which has a halo on the tributyrin agar plate and no orange fulorescent halo on olive oil and Rhodamine-B agar plate; 3. HB101 (pHZ1403); 4. *E. coli* HB101.

水解透明圈的重组子。将它们进行复筛后,发现只有 LE392 (pHZ1401) 在紫外 350nm 波长具有桔黄色荧光圈,而作为负对照的 LE392 则不显示这种荧光圈。

2.3 pHZ1401 的亚克隆

对 pHZ1401 的初步酶切分析揭示,此质粒携带了约 45kb 来自类产碱假单胞菌的 DNA 片段。将 pHZ1401 用 *Sau3AI* 酶切,以 pUC118 为载体进行亚克隆,从获得的转化子中初筛出 7 个能分解三丁酸甘油酯的菌落,经复筛确证其中二株在橄榄油平板出现桔黄色荧光圈,它们是 HB101 (HZ1402) 和 HB101 (pHZ1403)。后者形成的荧光圈比前者荧光圈大得多,因而似乎具有更强酶活(图 1)。

2.4 亚克隆子外源片段的酶切分析

分别用 *EcoRI*, *SacI*, *KpnI*, *SmaI*, *XbaI*, *SalI*, *PstI* 和 *HindIII* 八种内切酶对 pHZ1402 和



图2 pHZ1402和pHZ1403的限制酶图谱

Fig.2 Restriction maps of pHZ1402 and pHZ1403

培养 24 h 后,可以看到,HB101 (pHZ1403) 产生的水解圈最大,HB101 (pHZ1402) 次之,作为对照的类产碱假单胞菌最小,大肠杆菌 HB101 则无脂肪酶活性。

用 NaOH 直接滴定法检测酶活,将 HB101 (pHZ1403)、HB101 (pHZ1402) 接种于 LB, 37℃ 摇床 220 r/min 培养 16 h,酶活分别为 102 u/ml, 25 u/ml。类产碱假单胞菌接种于液体发酵培养基, 28℃ 摇床 (220 r/min) 培养 32 h,酶活为 20 u/ml。因此, HB101 (pHZ1403) 所分泌的酶的活性为 HB101 (pHZ1402) 的 4 倍,而比正对照菌株类产碱假单胞菌所分泌的酶的活性高 5 倍。

3 讨论

对脂肪酶的定性检测只用三丁酸甘油酯平板是不够的,因为在该平板上酯酶也可产生透明水解圈,影响挑选。用这种平板初筛是因为它比橄榄油平板易于制作且培养时间短,可较快地检出含酯酶或脂肪酶的菌株。再通过复筛得到真正含脂肪酶基因的菌株。

从获得的这两株工程菌的发酵实验结果看出酶活存在差异。因为检测的均为发酵液中的脂肪酶活力,所以这个差异也可能是由于分泌量不同造成的。通过限制酶酶切分析, pHZ1403 (6.2kb) 与 pHZ1402 (6.1kb) 的外源片段中含 2kb 的重叠区,它一定包含了脂肪酶的结构基因(图 2)。究竟是 pHZ1403 存在位于结构基因上游的正调控基

pHZ1403 进行酶切分析,制作的酶切图谱如图 2 所示, pHZ1402 和 pHZ1403 上所携带的外源片段中含约有 2kb 的重叠区,很显然脂肪酶的结构基因就在这 2kb 的 DNA 内。

2.5 酶活检测

将类产碱假单胞菌、HB101 (pHZ1402)、HB101 (pHZ1403) 及 HB101 分别点种于不加氨苄青霉素的三丁酸甘油酯平板上, 37℃

因还是 pHZ1402 存在位于结构基因下游的负调控基因,或是克隆的外源 DNA 片段的大小与酶分泌量有关等问题还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 施巧琴. 微生物学通报, 1981, 8(3): 108~110.
- [2] [美]J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著 (金冬雁, 黎孟枫等译). 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1995.
- [3] Zhou X F, Deng Z X, Hopwood D A *et al.* *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(7): 2096~2099.
- [4] [英]霍甫伍德等著 (邓子新, 唐纪良译). 链霉菌遗传操作实验手册. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1989. 169.
- [5] Chung G H, Lee Y P, Jeohn G H *et al.* *Agric Biol Chem*, 1991, 55(9): 2359~2365.
- [6] 蔡良琬. 核酸研究技术(上册). 北京: 科学出版社, 1987. 6.

CLONING AND EXPRESSION IN *ESCHERICHIA COLI* OF AN ALKALINE AND THERMOSTABLE EXOLIPASE FROM *PSEUDOMONAS PSEUDOALCALIGENES*

Weng Lixing^{1,2} Hu Zhihao¹ Deng Zixin¹ Shi Qiaoqin² Wu Songgang² Li Fudi¹

(¹Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070)

(²Fujian Normal University, Fuzhou 350007)

Abstract A gene coding for an alkaline and thermostable exolipase of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* was cloned into *Escherichia coli* LE392 by inserting Sau3 AI-generated DNA fragments into the BamHI site of pIJ285. Four colonies with esterase and lipase activities on the tributyrin agar plate were isolated by screening the constructed *pseudomonas pseudoalcaligenes* genomic library. Only one out of the four positive colonies showed lipase activity on the agar plate containing olive oil and Rhodamine-B. Subclones of the 45 kb insert carrying lipase gene was obtained in *E. coli* HB101 using pUC118 as a vector, two of which (HB101 (pHZ1402) and HB101 (pHZ1403)), retained lipase activity, but the level seems to be different. They carried 3.0 kb and 2.9 kb inserts with a 2 kb overlapping sequence. The lipase activity of HB101 (pHZ1403) is about 4 times higher than that of HB101 (pHZ1402), as 5 times as that of original strain *P. pseudoalcaligenes*.

Key words *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, Alkaline thermostable exolipase, Cloning